

English translation of a relevant portion of JP-A-09224655

From page 3, right column line 16 to page 4, left column line 2;

[0016]

[EXAMPLES]

[Example 1] The microbial strain T-0002 according to the present invention was cultured at 30 °C for 72 hours in an agar medium, pH 7.0 consisting of 1 g yeast extract, 1 g glucose, 0.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ , 0.2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 1000 ml distilled water. The resultant culture was centrifuged to give 20 g microorganism.

[0017] This microorganism was suspended via one loop of platinum in 2 ml aqueous solution containing 2 % Tween 80. Tomato seeds (Momotaro: a product of Takii & Co., Ltd.) sterilized with 10 % sodium hypochlorite for 3 minutes were immersed therein at 25 °C for 20 hours, then seeded in a rock wool seed mat impregnated with 1/2 U hydroponic solution (9 me/l  $\text{NO}_3\text{N}$ , 0.7 me/l  $\text{NH}_4\text{N}$ , 2.5 me/l  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 4.15 me/l  $\text{K}_2\text{O}$ , 1.9 me/l  $\text{MgO}$ , 2.8 me/l S, 4.65 me/l Ca, 0.6 ppm Mn, 0.125 ppm B, and 1.85 ppm Fe), grown at room temperature for 19 days until a two-leave seedling stage and planted in a rock wool seedling mat of 7.5×7.5×7.5 cm in size.

[0018] A tomato bacterial wilt-causing microorganism (Pseudomonas solanaserum) previously cultured for 2 days in PD liquid medium was inoculated at a density of  $5 \times 10^{10}$  cells/5 ml into the grown seedlings on Day 10 after planting. During the growth of the seedlings, the above-mentioned 1/2 U hydroponic solution was supplied to them. As the control, the seeds immersed in an aqueous solution containing 2 % Tween 80 at 25 °C for 20 hours were treated in an analogous manner. The test was conducted on five groups in each section, and the growth and onset thereof on Day 25 after planting were examined, and the effect of the microorganism on the control of the tomato bacterial wilt disease was investigated by comparison. The results are shown in Table 2.

[0019]

[Table 2]

Test on Control of Bacterial Wilt Disease in Rock-Wool Cultivation

	Degree of diseased plants <sup>1)</sup> (%)	Degree of onset <sup>2)</sup> (%)	Degree of Browning of vessels <sup>3)</sup> (%)	Weight of fresh plants over ground
Treated section	60	20	28	26.9
Control section	100	68	72	15.8

1) Degree of diseased plants (%) = Number of diseased plants / number of all plants × 100

2) & 3) were calculated in the following manner (N: continuous number)

Degree of onset & Browning of vessels =  $(5_{n5} + 4_{n4} + 3_{n3} + 2_{n2} + 1_{n1} + 0_{n0}) / (5 \times N)$

Onset index: 0, no onset; 1, very slight disease; 2, slight disease; 3, moderate disease; 4, serious disease; 5, withering.

Browning of vessels: 0, no browning; 1, about 1/5 browning; 2, about 2/5 browning, 3, about 3/5 browning; 4, about 4/5 browning; 5, weathering.

[0020] By treatment with the microorganism T-0002, the bacterial wilt disease was controlled and the plants tended to be excellent in growth with an increase in the weight thereof over the ground.



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09224655 A**(43) Date of publication of application: **02 . 09 . 97**

(51) Int. Cl.

**C12N 1/20**  
**A01N 63/00**  
**C09K 17/32**  
**/(C12N 1/20 , C12R 1:07 )**  
**C09K103:00**

(21) Application number: **08038012**(22) Date of filing: **26 . 02 . 96**

(71) Applicant: **YUUKISHITSU HIRYO SEIBUTSU**  
**KASSEI RIYOU GIJUTSU KENKYU**  
**KUMIAI**

(72) Inventor: **KINOOKA YUZO**  
**NOGUCHI KATSUNORI**

(54) **DISEASE INJURY-CONTROLLING**  
**MICROORGANISM AND DISEASE INJURY**  
**CONTROL USING THE SAME**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To accomplish preventing disease injuries due to *Pseudomonas solanaserum* hard to be prevented, by making a specific kind of microorganisms act on plant seeds and/or roots and/or the soil or nutriculture medium to raise such plant therein.

**SOLUTION:** Plant seeds and/or roots and/or the soil or nutriculture medium to raise such plant therein are treated with *Bacillus* sp. T-0002 having ability to inhibit the growth and infection of *Pseudomonas solanaserum*.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

細胞の形	桿 菌
大きさ	2~4 μm
幅	>1 μm
グラム染色	陽性
胞子の有無	あり
胞子の形	楕円
胞子の位置	中央あるいは先端
運動性の有無	なし
嫌気的条件下での生育	+
V-P反応	+
V-P培地のpH	<8
最高生育温度	45℃
最低生育温度	15℃
pH5.7培地での生育	+
栄養剤・pHでの生育	+
NaCl(5~10%)培地での生育	+

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-224655

(43) 公開日 平成9年(1997)9月2日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20			C 1 2 N 1/20	A
				E
A 0 1 N 63/00			A 0 1 N 63/00	F
C 0 9 K 17/32			C 0 9 K 17/32	H
// (C 1 2 N 1/20				

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-38012

(22) 出願日 平成8年(1996)2月26日

(71) 出願人 000246402

有機質肥料生物活性利用技術研究組合  
東京都北区西ヶ原1丁目26番3号

(72) 発明者 紀岡 雄三

茨城県土浦市並木5丁目5511番地 片倉チ  
ッカリン株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 野口 勝憲

茨城県土浦市並木5丁目5511番地 片倉チ  
ッカリン株式会社筑波総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 病害防除用微生物およびそれを用いた病害防除方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、シュードモナス・ソラナセラムによる病害を防除するための微生物及び該微生物による前記病害の防除方法を提供する。

【解決手段】 シュードモナス・ソラナセラム (Pseudo monas solanaserum) の生育および感染を抑制する能力を有するバチルス・エスピー (Bacillus sp.) T-0002。該菌株の菌体または培養物で植物の種子、根などの植物体あるいは植物体を栽培する土壌を処理することにより植物体のシュードモナス・ソラナセラムによる病害を防除する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 シュードモナス・ソラナセラム (*Pseudomonas solanaseum*) の生育および感染を抑制する能力を有するバチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) T-0002。

【請求項 2】 植物の種子、根などの植物体をバチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) T-0002の菌体または培養液で処理することを特徴とする植物体のシュードモナス・ソラナセラムによる病害の防除方法。

【請求項 3】 植物体を栽培する土壌または養液栽培培地をバチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) T-0002の菌体または培養液で処理することを特徴とする植物体のシュードモナス・ソラナセラムによる病害の防除方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、シュードモナス・ソラナセラムによる病害を防除するための微生物及び該微生物による前記病害の防除方法を提供する。

## 【0002】

【従来の技術】農業において、作物の病害は主として土壌伝染性微生物によって起こり、生産性の低下などの重要な問題となっている。土壌伝染性微生物による病害はフザリウム菌により萎凋病、つる割れ病、半身萎凋病、萎黄病など、リゾクトニア菌による根腐病、疫病、苗立枯れ病、パーティシリウム菌による半身萎凋病、黄化病など、白紋羽病菌や紫紋羽病菌による野菜および果樹の紋羽病、そしてシュードモナス菌によるナス科植物であるトマトやナスなどの青枯病、タバコの立枯病などが知られており、何れも大きな問題となっている。

【0003】これらの病害の防除には抵抗性品種の導入や薬剤消毒が主体となっている。しかしながら、これらの方法だけでは完全な防除は困難である。最近では環境問題がクローズアップされ、生態系調和型農業が求められるようになり有用微生物を用いた病害防除の試みがなされている。現在世界的には、トリコデルマ属菌、グリオクラチウム属菌、バチルス属菌などを各種土壌伝染性糸状菌の防除に用いている。

【0004】シュードモナス・ソラナセラム (*Pseudomonas solanaseum*) による病害の防除に関しては、薬剤防除として臭化メチルやクロルピクリンなどの土壌くん蒸剤が使用されているが、費用や労力を要する割には、病原菌の水などによる移動により再発することが多く、効果の持続性が低い。また近年では、拮抗微生物による生態防除として蛍光性シュードモナスによる防除 (相野ら、1990)、非病原性シュードモナスによる防除 (相澤ら、1993)、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) による防除 (正田ら、1990)、VA菌根菌による防除 (小林ら、1989) などがあるが十分な実用段階には至っていない。しかしながら、今後有用微生物を利用した生態的防除は、ますます重要になるものと考えられる。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、難防除病害であるシュードモナス・ソラナセラムによるナス科植物であるトマト、ナスなどの青枯病、タバコの立枯病の防除に有効な微生物、及び該微生物を用いた前記病害の防除方法を提供するものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、シュードモナス・ソラナセラム (*Pseudomonas solanaseum*) の生育および感染を抑制する能力を有するバチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) T-0002である。

【0007】さらに、本発明は、植物の種子、根などの植物体をバチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) T-0002で処理することを特徴とする植物体のシュードモナス・ソラナセラムによる病害の防除方法である。さらに、本発明は、植物体を栽培する土壌または養液栽培培地をバチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) T-0002で処理することを特徴とする植物体のシュードモナス・ソラナセラムによる病害の防除方法である。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明者らは、シュードモナス・ソラナセラムに対して強い抑制作用を有する菌を検索した結果、栃木県小山市のトマト栽培ハウスのトマト根面よりシュードモナス・ソラナセラムに対して強い抑制効果を有するT-0002菌を採取した。この菌株の菌学的性質は表1の通りである。

## 【0009】

【表1】

細胞の形	桿 菌
大きさ	2~4 $\mu$ m
幅	>1 $\mu$ m
グラム染色	陽性
胞子の有無	あり
胞子の形	橢円
胞子の位置	中央あるいは先端
運動性の有無	なし
嫌気的条件下での生育	±
V-P反応	+
V-P培地のpH	<8
最高生育温度	45℃
最低生育温度	15℃
pH5.7培地での生育	+
ニュートリント・ブロスでの生育	+
NaCl(5~10%)培地での生育	+
糖類からの酸生成	
グルコース	+
アルビノース	+
キシロース	+
マンニトール	+
トレハロース	+
デンプンの加水分解	+
チロシンの加水分解	+
カゼインの加水分解	+
生育可能pHの範囲	5~10
グリコリル試験	陽性
菌体脂肪酸	
分枝酸	82.5%
直鎖飽和酸	10.0
不飽和酸	7.5
キノン	MK
DNA中のG+C含量	36%

【0010】本菌株は、上記菌学的特徴において桿状で胞子を形成し、主として好気的条件下で増殖する菌である

からバチルス属に分類される。本菌の類縁種としてはバチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*) あるいはバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) があげられるが、運動性がないことからバチルス・ミコイデスにより近い種である。しかしデンプンおよびチロシンを分解しない点でバチルス・ミコイデスと異なり、本菌株はバチルス属の新菌種であると認定した〔ジョン・ジ・ホルト他：バーギーズ・マニュアル オブ システムティック バクテリオロジー第2巻 (JOHN G HOLT et al., BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology), 1104-1139, 1986年〕。

【0011】この菌株は、平成8年2月6日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所にバチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) T-0002として寄託し、寄託番号はFERMP 15423である。この菌株の培養法は通常の細菌の培養法が用いられ、液体培地による振盪培養法または通気攪拌培養法等が好ましい。使用する栄養培地において、炭素源としては例えばグルコース、トレハロース等の糖質類が、窒素源としては、例えば、ペプトン、ポリペプトン、バクトトリプトン等のカゼイン分解物あるいはソイトン等の大豆タンパク質分解物等が用いられ、そして必要により、酵母エキス、リボフラビン等のビタミン類及びリン酸塩、マグネシウム塩、塩化ナトリウム、微量金属等のミネラル類が用いられる。pHは、本菌が生育するpH域ならばいずれでもよいが、通常は、6～8の範囲が好ましい。

【0012】培養条件は、例えば、通常20～40℃で、16時間～4日間振盪培養または通気攪拌培養を行なう。本発明において用いられるバチルス・エスピーT-0002菌は、トマトの根面より分離された土壌生息菌の一種であることから、土壌中での生育が可能であり、作物の根圏に広く伝播する。従って、環境への影響はなく、生態調和型農業に貢献するものである。とくにT-0002菌の菌体または培養液で種子を処理すれば効果が高く、経済的、労力的にも貢献できる。この場合のT-0002菌の菌体または培養液の使用量は種子1粒当たり $10^3$ 個以上となる量が望ましい。

【0013】また、T-0002菌の菌体または培養液を土壌に混和することによって、生態防除をはかることもできる。この場合のT-0002菌の菌体または培養液の使用量は土壌1g当たり $10^3$ 個以上となる量が望ましい。養液栽培の場合はT-0002菌の培養液または菌体を水耕液あるいは栽培培地へ添加することにより、生態防除をはかるこ

ともできる。この場合のT-0002菌の菌体または培養液の使用量は1ml当たり $10^3$ 個以上となる量が望ましい。

【0014】本菌株をバーミキュライト、ゼオライト、バーライトおよび木炭などの多孔質資材に吸着したり、大豆油かす、乾血、脱膠骨粉あるいは魚粕などの基質に培養したり、基質と多孔質資材の混合物に培養したり、その培養物を育苗培土に混合したり、また、畑に施用することもできる。この基質や多孔質資材は本菌株の生育を阻害しないものであれば特に限定されるものではない。この場合のT-0002菌の菌体または培養液の基質や多孔質資材に対する混合量は0.1%～50%が望ましい。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0016】

【実施例】

【実施例1】本発明に係わる菌株T-0002を酵母エキス1g、グルコース1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g、蒸留水1000ml、pH7.0の寒地培地を用いて、30℃で72時間培養を行った。得られる培養液を遠心分離処理して菌体20gを得た。

【0017】この菌体を1白金耳とり、2%Tween80を含む水溶液2mlに懸濁させた。そこへ10%次亜塩素酸ソーダで3分間殺菌したトマト種子（桃太郎：タキイ種苗）を25℃で20時間浸漬し、1/2単位水耕液 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ : 9me/l,  $\text{NH}_4\text{-N}$ : 0.7me/l,  $\text{P}_2\text{O}_5$ : 2.5me/l,  $\text{K}_2\text{O}$ : 4.15me/l,  $\text{MgO}$ : 1.9me/l,  $\text{S}$ : 2.8me/l,  $\text{Ca}$ : 4.65me/l,  $\text{Mn}$ : 0.6ppm,  $\text{B}$ : 0.125ppm,  $\text{Fe}$ : 1.85ppm) を含浸したロックウール播種マットに播種し、室温内で19日間二葉展開まで育苗し、7.5×7.5×7.5cmのロックウール育苗マットへ移植した。

【0018】移植10日後にPD液体培地で2日間培養したトマト青枯病菌 (*Pseudomonas solanaseum*) を $5 \times 10^{10}$  cells/5ml接種した。育苗期間中は適時、上記1/2単位水耕液を供給した。対照として、種子を2%Tween80を含む水溶液に25℃、20時間浸漬したものを同様に処理した。試験は各区5連で行ない、移植25日後の生育と発病を調査し、トマト青枯病に対する防除効果を比較検討した。その結果を表2に示した。

【0019】

【表2】

ロックウール栽培における青枯病に対する防除試験

	発病株率 <sup>1)</sup> %	発病度 <sup>2)</sup> %	導管褐変度 <sup>3)</sup> %	地上部新鮮重 g
処理区	60	20	28	26.9
対照区	100	68	72	15.8

1) 発病株率 = 発病株数 / 全株数 × 100

2), 3) 以下の方法により算出した (N: 連数)

発病度、導管褐変度 =  $(5n_5 + 4n_4 + 3n_3 + 2n_2 + 1n_1 + 0n_0) / (5 \times N)$ 

発病指数 0: 未発病、1: 微症、2: 軽症、3: 中症、4: 重症、5: 枯死

導管褐変度 0: 未褐変、1: 1/5程度褐変、2: 2/5程度褐変、3: 3/5程度褐変、4: 4/5程度褐変、5: 枯死

【0020】T-0002菌処理により青枯病が抑制され、地上部新鮮重が重くなり、生育が優れる傾向にあった。

【0021】〔実施例2〕T-0002菌とトリプトソイ寒地培地で培養し、その菌体を1白金耳とり、滅菌水(Tween20を2%含有)に懸濁した。そこへ殺菌種子(0.35%次亜塩素酸ソーダ溶液に2分間浸漬)10粒を入れ、30℃で20時間バクテリアゼーションを行った。この種子(大型

福寿)を培土に充填したプラグトレイに播種し、2週間後に青枯病菌を接種した病土400gを充填した12cmポリポットへ鉢上げを行った。試験は1区5連で行ない、発病状況を調査した。結果を表3に示した。

【0022】

【表3】

土耕栽培における青枯病に対する防除試験

	発病度 %	地上部新鮮重 g/株
処理区	26	26.5
対照区	52	21.2

発病度 =  $(5n_5 + 4n_4 + 3n_3 + 2n_2 + 1n_1 + 0n_0) / (5 \times N)$ 

発病指数 0: 未発病、1: 微症、2: 軽症、3: 中症、4: 重症、5: 枯死

【0023】T-0002菌を接種することにより、青枯病菌の感染を防ぎ、発病が少なくなり、生育も優る傾向にあった。

【0024】〔実施例3〕T-0002菌をペプトン・酵母エキス液体培地で培養し、その菌培養液300mlをトマト(品種: 桃太郎エイト)を定植した株元へ灌注した。その後栽培期間中に7回灌注(1回当たり1000l/10aの割合で20cmの深さに灌注した)を行ない、発病抑制効果を調査した。試験は1区30株程度で2連で行ない、その結果を図1に示した。図1より明らかなどおりT-0002菌を灌注することにより、防除価を40%以上に保つことが

できた。

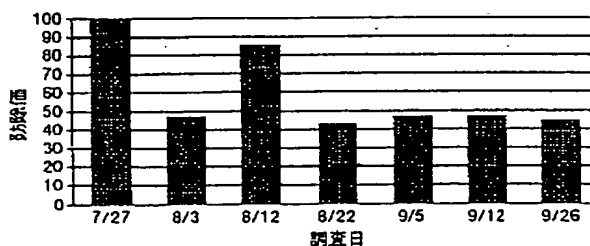
【0025】

【発明の効果】本発明は、根面より選抜した有効菌であり、作物との親和性が高く、特にシュードモナス・ソラナセラムの感染抑制を示すことから、難防除病害であるナス科植物のトマト、ナスなどの青枯病、タバコの立枯病抑制菌として利用でき、作物の生産性を高めることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】圃場における青枯病防除試験の結果を示す図。

【図1】

防除価 =  $(1 - \text{試験区の発病株数} / \text{対照区の発病株数}) \times 100$

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 R 1:07)

C 0 9 K 103:00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所